

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-026866

(43)Date of publication of application : 29.01.2004

(51)Int.Cl. C08F220/60  
 A61K 47/48  
 A61K 48/00  
 C08F218/14  
 C12N 15/00  
 // C08L101/16

(21)Application number : 2002-181003

(71)Applicant : YAMAOKA TETSUJI  
 NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED  
 INDUSTRIAL & TECHNOLOGY  
 TOYOBO CO LTD  
 KONAN KAKO KK

(22)Date of filing : 21.06.2002

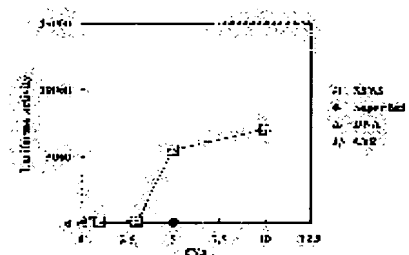
(72)Inventor : YAMAOKA TETSUJI  
 TOKIWA YUTAKA  
 KITAGAWA MASARU  
 SHIMAKAWA HIROMI

## (54) CARRIER FOR GENE TRANSMISSION

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a highly in vivo safe carrier for effective gene transmission to a target tissue or cell.

SOLUTION: The carrier comprises a new structure sugar-containing copolymer and used for preparation of the carrier for gene transmission.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

10.03.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3783102

[Date of registration]

24.03.2006

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-26866

(P2004-26866A)

(43) 公開日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C08F 220/60

A61K 47/48

A61K 48/00

C08F 218/14

C12N 15/00

F I

C08F 220/60

A61K 47/48

A61K 48/00

C08F 218/14

C12N 15/00

Z B P

Z

テーマコード (参考)

4C076

4C084

4J100

4J200

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-181003 (P2002-181003)

(22) 出願日 平成14年6月21日 (2002.6.21)

(71) 出願人 502224098

山岡 哲二

京都府京都市左京区松ヶ崎御所海道町 京

都工芸繊維大学繊維学部高分子学科内

(71) 出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関1-3-1

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(71) 出願人 391045392

甲南化工株式会社

大阪府高槻市中川町5番21号

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二

最終頁に続く

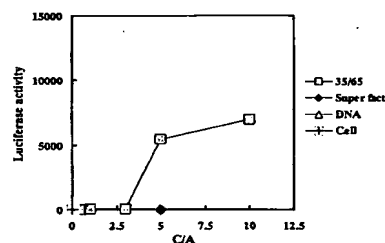
(54) 【発明の名称】 遺伝子送達用担体

(57) 【要約】

【課題】 目的とする組織や細胞に対し、効率的に遺伝子導入を行うことができ、生体内での安全性も高い遺伝子送達用担体を提供すること。

【解決手段】 新規な構造を有する糖含有共重合体、並びに該糖含有共重合体を用いて形成された遺伝子送達用担体。

【選択図】 図2



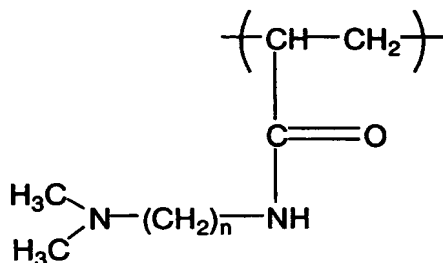
## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記一般式 (I) 及び (II) で表される繰り返し単位を有し、(I) と (II) のモル比率が 1 : 9 ~ 9 : 1 であって、且つ、重量平均分子量が  $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8$  である糖含有共重合体。

一般式 (I) :

【化 1】

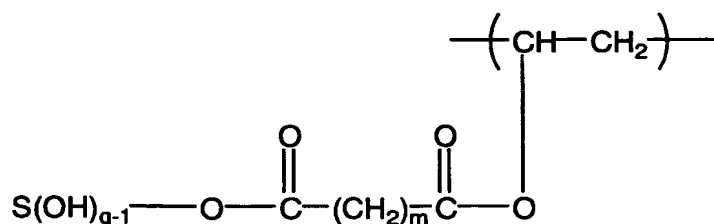


10

(式中、n は 1 ~ 10 を示す。)

一般式 (II) :

【化 2】



20

(式中、 $\text{S(OH)}_{q-1}$  は、糖骨格 S とそれに結合する q 個の水酸基からなる糖化合物から 1 個の水酸基を除いた糖残基を示し、m は 2 ~ 10 を示す。)

## 【請求項 2】

30

(I) と (II) のモル比率が 2 : 8 ~ 3 : 7 である、請求項 1 に記載の糖含有共重合体。

## 【請求項 3】

重量平均分子量が  $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  である、請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の糖含有共重合体。

## 【請求項 4】

一般式 (I) における n が 3 であって、一般式 (II) における m が 4 である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の糖含有共重合体。

## 【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の糖含有共重合体から形成される遺伝子送達用担体。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、糖を含有する共重合体、並びに該共重合体から形成される遺伝子送達用担体に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

最近注目されている遺伝子治療では、患者の体内から取り出した細胞に培養系で外来遺伝子を導入し、形質転換細胞を増殖させた後に患者に再移植する「Ex vivo 遺伝子導入法」が主として実施されている。この場合、患者から単離できる細胞は限られているた

50

め、多くの場合末梢血リンパ球が利用されている。しかし、ターゲットとなる細胞は、その対象疾患によって異なり、特に体細胞や臓器組織の細胞をターゲットとする場合には、外来遺伝子をコードするプラスミドDNAを直接生体に投与する必要がある(In vivo遺伝子導入法)。

【0003】

In vivo遺伝子導入法は、多くの研究者によって検討が行われており、遺伝子を効率よく生体内に導入し、安全性が確保できる遺伝子送達用担体の開発が強く望まれている。

【0004】

一方、米国FDAにより認可されている、遺伝子治療プロトコルの85%以上においては、アデノウイルスやレトロウイルスなどが使用されている(Annu. Rev. Microbiol., 49, 807, 1995)。ウイルスによる遺伝子導入効果は極めて高く、有効であるが、米国で実施された遺伝子治療においてはウイルスに対する免疫反応が原因と考えられる事故が起こるなど、ウイルス増殖などの危険性が指摘されていた。

【0005】

そのため、カチオニックリポソーム(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413, 1987)やカチオンポリマー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7297, 1995, Bioconjugate Chem., 6, 7, 1995)などの非ウイルス性担体を遺伝子送達用担体として用いることが検討されてきた。具体的には、従来、ジエチルアミノエチルデキストラン(DEAE-dex)やポリ-L-リジン(PLL)などの直鎖状ポリカチオンが検討されてきた。

【0006】

ポリカチオンの遺伝子導入効率はリポソームより低い、リポソームに比べて生体内に直接投与したときに肝臓に集積する傾向が少なく、体内動態のコントロールが比較的容易であるという利点がある。しかし、ポリカチオンの一つで、従来、遺伝子送達用担体として精力的に検討されてきたポリ-L-リジンは、近年その遺伝子導入能が極めて低いことが報告された。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な構造を有する糖含有共重合体、並びに、該糖含有共重合体から形成される遺伝子送達用担体を提供することを主な目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、水溶性で体内動態制御が容易であって、効率的に遺伝子導入を行うことができる高分子化合物について鋭意研究した結果、特定の構造を有する糖含有共重合体から形成される担体が、優れた効果を奏することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明は、以下の事項に係る。

【0010】

項1：下記一般式(I)及び(II)で表される繰り返し単位を有し、(I)と(II)のモル比率が1:9~9:1であって、且つ、重量平均分子量が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8$ である糖含有共重合体。

一般式(I)：

【0011】

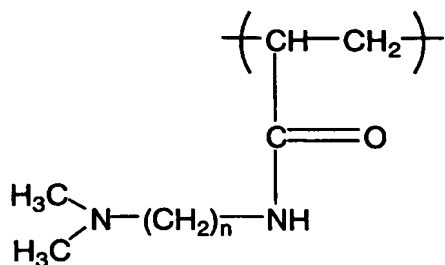
【化3】

10

20

30

40



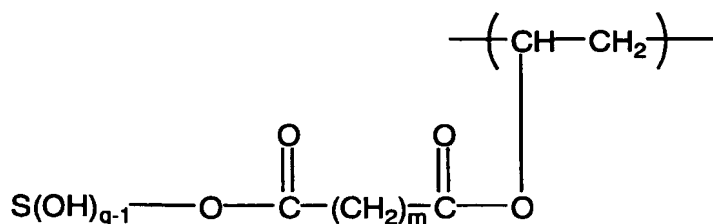
【0012】

(式中、nは1～10を示す。)

一般式(II)：

【0013】

【化4】



【0014】

(式中、S(OH)<sub>q-1</sub>は糖骨格Sとそれに結合するq個の水酸基からなる糖化合物から1個の水酸基を除いた糖残基を示し、mは2～10を示す。)

項2：(I)と(II)のモル比率が2：8～3：7である、項1に記載の糖含有共重合体。

【0015】

項3：重量平均分子量が5×10<sup>6</sup>～2×10<sup>7</sup>である、項1又は2のいずれかに記載の糖含有共重合体。

【0016】

項4：一般式(I)におけるnが3であって、一般式(II)におけるmが4である、項1乃至3のいずれかに記載の糖含有共重合体。

【0017】

項5：項1乃至4のいずれかに記載の糖含有共重合体から形成される遺伝子送達用担体。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について具体的に説明する。

【0019】

糖含有共重合体

本発明の糖含有共重合体は一般式(I)及び(II)で表される繰り返し単位を有する。

一般式(I)：

【0020】

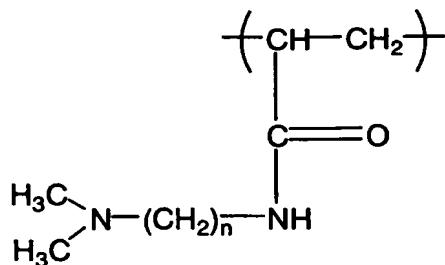
【化5】

10

20

30

40



【0021】

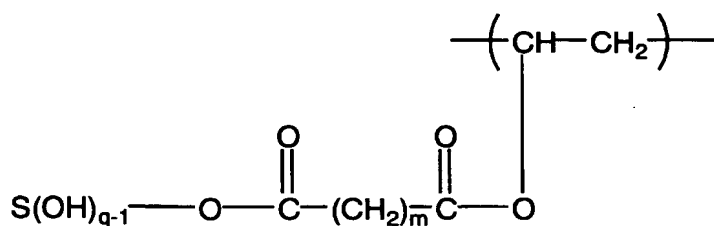
(式中、nは1～10を示す。)

一般式(II)：

【0022】

【化6】

10



20

【0023】

(式中、 $\text{S}(\text{OH})_{q-1}$ は、糖骨格Sとそれに結合するq個の水酸基からなる糖化合物から1個の水酸基を除いた糖残基を示し、mは2～10を示す。)

糖含有共重合体における、一般式(I)及び(II)のモル比率は、1：9～9：1程度であって、目的に応じて、適宜調整して使用される。

【0024】

特に、一般式(I)及び(II)のモル比率が2：8～3：7程度であるものが、DNAと複合体を形成し易く、遺伝子の発現効率が高い点で好ましい。

30

【0025】

一般式(I)におけるnは1～10、また一般式(II)におけるmは2～10を示し、所望の性質を有する共重合体を得ることを目的として、適宜設定することができる。

【0026】

特に一般式(I)におけるnが3であって、かつ、一般式(II)におけるmが4である糖含有共重合体が、遺伝子との複合体形成のし易さ及び細胞への取り込み時に糖質の細胞への親和性が高まる点において、好ましい。

【0027】

糖含有共重合体の分子量は、通常、重量平均分子量で $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8$ 程度である。特に、 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 程度であるものが、遺伝子の発現効率が高い点で好ましい。

40

【0028】

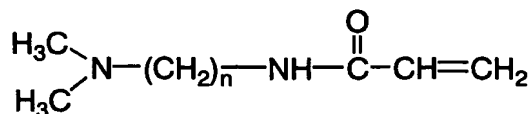
#### 糖含有共重合体の製造方法

本発明の糖含有共重合体は、一般式(III)で表されるカチオン性単量体と、一般式(IV)で表される糖含有単量体を、重合することによって得ることができる。

一般式(III)：

【0029】

【化7】



【0030】

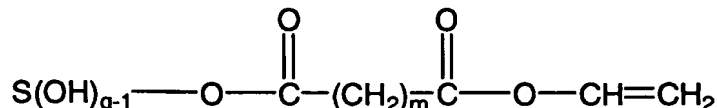
(式中、 $n$  は 1 ~ 10 を示す。)

一般式 (I V) :

【0031】

【化 8】

10



【0032】

(式中、 $\text{S(OH)}_{q-1}$  は、糖骨格  $\text{S}$  とそれに結合する  $q$  個の水酸基からなる糖化合物から 1 個の水酸基を除いた糖残基を示し、 $m$  は 2 ~ 10 を示す。)

一般式 (I I I) で表されるカチオン性単量体における  $n$  の値は、目的に応じて適宜設定することができるが、特に、 $n = 3$  である、ジメチルアミノプロピルアクリルアミドが、製造し易さなどの点から好ましい。

20

【0033】

また、一般式 (I V) で表される糖含有単量体における  $m$  の値も、目的に応じて適宜設定することができるが、特に  $m = 4$  であるビニルアジピン酸エステルが、安定性、合成し易さなどの点からみて、好適である。

【0034】

また、一般式 (I V) における糖骨格  $\text{S}$  を有する糖化合物としては、例えば、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、スクロース、マルトース、デンプン、セルロース等の単糖、小糖、多糖及び多糖の加水分解生成物等の天然糖及び合成糖などが挙げられる。このうち、グルコースが、製造し易さなどの点で好ましい。

30

【0035】

一般式 (I I I) で表されるカチオン性単量体と、一般式 (I V) で表される糖含有単量体を、重合する方法としては、例えば、ラジカル重合等が挙げられる。

【0036】

また、重合開始剤としては、通常のラジカル重合開始剤を用いることができ、例えば、アゾイソブチルニトリル (A I B N) 等のアゾ系開始剤や有機過酸化化物などを使用することができる。

【0037】

#### 遺伝子送達用担体

本発明の糖含有共重合体は、遺伝子送達用担体として、好適に使用することができる。

40

【0038】

遺伝子送達において、担体となる糖含有共重合体は、静電的作用によって遺伝子を凝縮し、複合体を形成する。この複合体がエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれ、遺伝子が細胞内に送達されることとなる。

【0039】

本発明の糖含有共重合体は、一般式 (I) で表される繰り返し単位を有し、生理的 pH 範囲内で正電荷を有する残基を含んでいることから、静電的作用によって DNA 等の分子を凝縮し、より効率良く、遺伝子を導入することができる。

【0040】

また、本発明の共重合体は、一般式 (I I) で表される繰り返し単位を有し、糖骨格及び

50



非電荷親水基を含んでいることから、水溶性や生分解性が向上し、体内動態制御がより容易となっている。

【0041】

特に、(I)と(II)をモル比率2:8~3:7で有する共重合体とすることによって、より高い遺伝子発現効率が可能となる。

【0042】

担体により運ばれる遺伝子としては、DNA又はRNAであれば特に制限されないが、例としては、特定の蛋白質をコードする遺伝子やアンチセンスDNAなどが挙げられる。

【0043】

また複合体における糖含有共重合体と遺伝子の比率は、糖含有共重合体のカチオン基のモル数(C)のDNA又はRNAのリン酸基のモル数(A)に対する比率(以下、これをC/A比と言う)で表して、通常2.5以上、好ましくは5以上、さらに好ましくは10以上である。C/A比が大きくなるほど発現効率は高くなる。

【0044】

糖含有共重合体と遺伝子との複合体を形成する方法は特に限定されず、例えば、遺伝子を含む溶液と、糖含有共重合体を含む溶液を混合することによって、適宜調整することができる。

【0045】

【実施例】

以下、実施例及び比較例を用いて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに

【0046】

実施例1~4:糖含有共重合体の作成

ジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMAPAA:Dimethylamino propyl acrylamide)と6-ビニルアジポイルグルコース(GVA:6-vinyl adipoyl glucose)を、表1に示した仕込み比で用いた。溶媒として、ジメチルスルホキシド(DMSO:Dimethyl sulfoxide)、重合開始剤として、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN:Azobisisobutyronitrile)を用い、反応温度60℃で、真空下4時間重合した。

【0047】

得られた糖含有共重合体の収率、重量平均分子量、およびNMR測定により求めた共重合組成比を、表1に示す。なお、平均分子量は、ディテクターとしてGPC/RIDディテクター(島津社製)、またカラムとして $\alpha$ -M(東ソー)を用い、プルラン換算分子量で算出した。

【0048】

【表1】

表 1

試料	DMAPAA:GVA 仕込比(mol%)	重合開始剤 (mol%)	収率(%)	分子量 ( $\times 10^5$ )	共重合比 (モル比)
実施例1	35:65	0.5	7	59	25:75
実施例2	35:65	1.0	9	120	26:74
実施例3	35:65	1.5	15	150	27:73
実施例4	35:65	2.0	20	1200	25:75

【0049】

実施例5:糖含有共重合体-DNA複合体の調製

DNAとしては、プラスミド pCMV-Luc を用いた。実施例 2 で作成した糖含有共重合体 2.4 mg を 1000  $\mu$ l の D-MEM 培地に溶解してストック溶液を作製した。このストック溶液 5  $\mu$ l と pCMV-Luc 溶液 45  $\mu$ l (pCMV-Luc を 100 ng 含有) を混合することで、C/A 比 = 50 とした。ストック溶液を段階希釈し、同濃度の pCMV-Luc 溶液と混合することで、C/A 比の異なる試料溶液 (C/A 比 = 0.5、1.0、3.0、5.0、10.0) を調製した。

異なる C/A 比の試料について、ルシフェラーゼ遺伝子 pCMV-Luc を混合して、電気泳動を行った。結果を図 1 に示す。

#### 【0050】

この結果、糖含有共重合体と DNA との C/A 比が 3 より大きいもので、バンドが一本となり、本発明の糖含有共重合体と DNA との複合体が形成されていることが確認できた。

10

#### 【0051】

実施例 6：遺伝子導入の評価

96 穴マルチプレートの各ウェルに COS-1 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well 播種し、24 時間後にリン酸緩衝溶液 (PBS) で洗浄後、上清を除去した。各ウェルに、上記実施例 5 で作成した複合体溶液 50  $\mu$ l /well を、種々の C/A 比によって別々に添加し、さらに、200  $\mu$ M のクロロキンを含む血清不含の D-MEM 50  $\mu$ l 添加した。37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 12 時間培養した後、PBS で洗浄して、10% の血清を含む D-MEM 培地 (100  $\mu$ l /ウェル) に交換し、さらに 40 時間培養を続けた。細胞を PBS 洗浄後、50  $\mu$ l の Triton X-100 で 30 分間処理して細胞を溶解し、その一部 (20  $\mu$ l) をサンプリングし、100  $\mu$ l の発光基質液と混合した。各ウェルの発光強度をルミカウンターで定量することにより、遺伝子の発現効率を測定した。

20

#### 【0052】

測定結果を図 2 ～ 図 3 に示す。

#### 【0053】

図 2 は、遺伝子発現効率の測定結果を、ルシフェラーゼ活性で示したものである。また図 3 は、遺伝子発現効率の測定結果を、タンパク当たりのルシフェラーゼ活性で示したものである。

#### 【0054】

図 2 ～ 図 3 に示されるように、DNA、細胞のみでは当然活性は見られなかった。また、比較例として、末端に荷電したアミノ基を有し、糖を含有しない重合体 (Superfect<sup>TM</sup>、C/A 比 = 5.0、QIAGEN 社) を用いて、発現効率の違いを調べたところ、本発明の糖含有共重合体を用いた複合体は、Superfect<sup>TM</sup> と比べて、より高い遺伝子発現効率を有することが確認された。また、C/A 比が大きくなるほど発現効率が高くなることが確認された。

30

#### 【0055】

##### 【発明の効果】

上述した結果に示されるように、本発明の糖含有共重合体から形成される遺伝子送達用担体は、従来の遺伝子送達用担体と比べて、より高い遺伝子発現効率を示す。また、本発明の共重合体は、生分解性や水溶性が向上しており、体内動態制御が容易であって、高分子分野や医学分野においてより有用に利用し得る。

40

##### 【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、種々の C/A 比からなる糖含有共重合体と遺伝子 pCMV-Luc との複合体の、アガロースゲル (0.8%) 電気泳動を示す図である。

【図 2】図 2 は、COS-1 細胞へ遺伝子を導入し、遺伝子の発現効率を測定した図である (ルシフェラーゼ活性で示した場合)。

【図 3】図 3 は、COS-1 細胞へ遺伝子を導入し、遺伝子の発現効率を測定した図である (タンパク当たりのルシフェラーゼ活性で示した場合)。

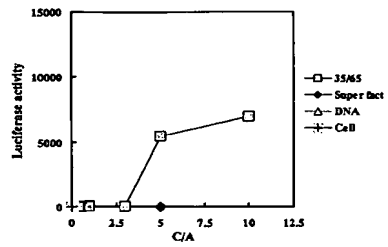
【図 1】

C/A 0 0.5 1 3 5 10

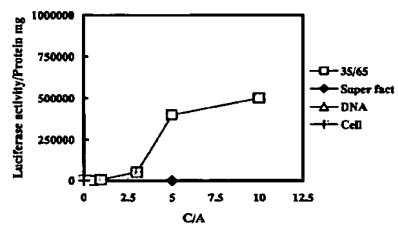
←ポリマーと遺伝子のコンプレックス  
←遺伝子 pCMV-Luc

+

【図 2】



【図 3】



## フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード (参考)  
 // C O 8 L 101/16 C O 8 L 101/16

(74)代理人 100076510  
 弁理士 掛樋 悠路  
 (74)代理人 100086427  
 弁理士 小原 健志  
 (74)代理人 100090066  
 弁理士 中川 博司  
 (74)代理人 100094101  
 弁理士 館 泰光  
 (74)代理人 100099988  
 弁理士 斎藤 健治  
 (74)代理人 100105821  
 弁理士 藤井 淳  
 (74)代理人 100099911  
 弁理士 関 仁士  
 (74)代理人 100108084  
 弁理士 中野 睦子  
 (72)発明者 山岡 哲二  
 京都府京都市左京区松ヶ崎御所海道町 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科内  
 (72)発明者 常盤 豊  
 茨城県つくば市東 1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内  
 (72)発明者 北川 優  
 滋賀県大津市堅田 2-1-1 株式会社東洋紡総合研究所内  
 (72)発明者 嶋川 博己  
 大阪府高槻市中川町 5-2-1 甲南化工株式会社内  
 F ターム(参考) 4C076 DD66 EE59 FF02  
 4C084 AA13 BA35 BA42 NA11  
 4J100 AG08Q AM21P BA03Q BA15Q BA31P CA04 DA01 FA03 JA50 JA53  
 4J200 AA02 BA01 BA03 BA23 BA27 DA22 EA04 EA11

[JP,2004-026866,A]

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

#### [Field of the Invention]

This invention relates to the copolymer containing sugar, and the support for gene delivery formed in a list from this copolymer.

[0002]

#### [Description of the Prior Art]

In the gene therapy which attracts attention recently, a foreign gene is introduced into the cell taken out from a patient's inside of the body by the culture system, and after proliferating a transformed cell, the "Ex vivo transgenics method" which carries out replantatio to a patient is mainly enforced. In this case, since the cell which can be isolated from a patient is restricted, in many cases, the peripheral blood lymphocyte is used. However, to the cell used as a target change with the object diseases and use a somatic cell and the cell of an organ organization as a target especially, it is necessary to medicate a direct living body with the plasmid DNA which carries out the code of the foreign gene (In vivo transgenics method).

[0003]

In Examination is performed by many researchers, a vivo transgenics method introduces a gene efficiently in the living body, and development of the support for gene delivery which can secure safety is desired strongly.

[0004]

On the other hand, the adenovirus, the retrovirus, etc. are used in 85% or more of the gene therapy protocol approved by U.S. FDA (Annu.Rev.Microbiol., 49, 807, 1995). Although the transgenics effectiveness by the virus was very high and it was effective, danger, such as virus growth -- the accident in which the immunoreaction to a virus is considered to be the cause in the gene therapy carried out in the U.S. happens -- was pointed out.

[0005]

Therefore, using non-viral support, such as cationic liposome (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, 7413, 1987) and a cation polymer (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 92, 7297, 1995, Bioconjugate Chem., 6, 7, 1995), as support for gene delivery has been examined. Specifically, straight chain-like poly cations, such as a diethylaminoethyl dextran (DEAE-dex) and poly-L-lysine (PLL), have been examined conventionally.

[0006]

Although the transgenics effectiveness of the poly cation is lower than liposome, when a medicine is directly prescribed for the patient in the living body compared with liposome, there are few inclinations accumulated on liver, and there is an advantage that control of a moving

state in the living body is comparatively easy. However, it was conventionally reported by one of the poly cations that the transgenics ability of the poly-L-lysine energetically examined as support for gene delivery is very low in recent years.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

This invention sets it as the main objects to offer the support for gene delivery formed in the sugar content copolymer which has new structure, and a list from this sugar content copolymer.

[0008]

[Means for Solving the Problem]

this invention person came to complete a header and this invention for the support formed from the sugar content copolymer which has specific structure doing the outstanding effectiveness so, as a result of inquiring wholeheartedly about the high molecular compound which can perform transgenics efficiently [ in-the-living-body moving state control is easy, and ] by water solubility.

[0009]

That is, this invention relates to the following matters.

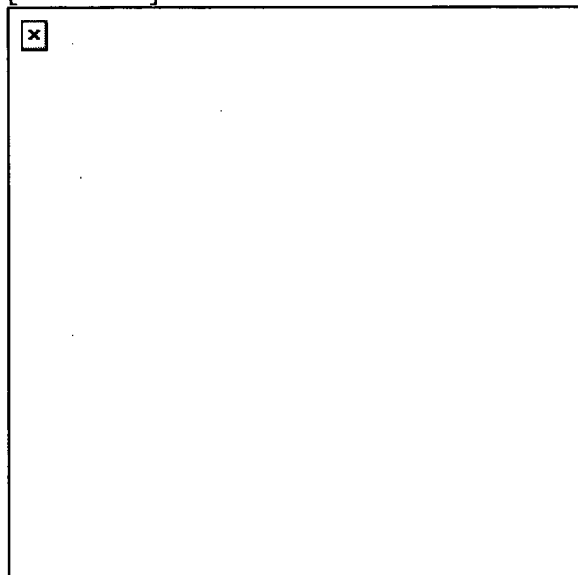
[0010]

Term 1: The sugar content copolymer whose weight average molecular weight it has the repeat unit expressed with the following general formula (I) and (II), and the mole fraction of (I) and (II) is 1:9-9:1, and is  $1 \times 10^4$  to  $5 \times 10^8$ .

General formula (I) :

[0011]

[Formula 3]



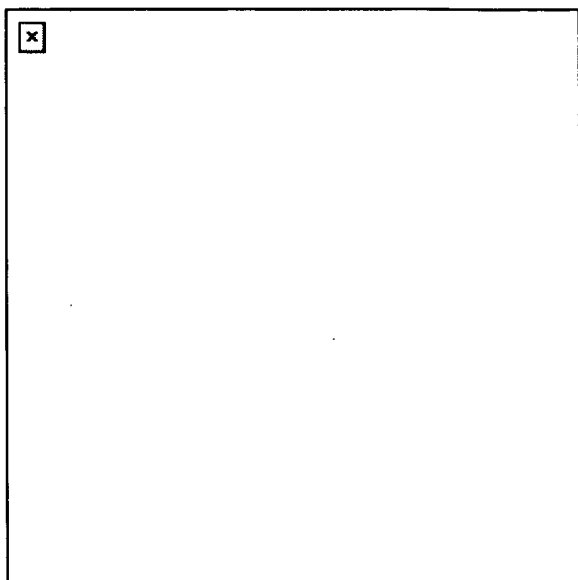
[0012]

(n shows 1-10 among a formula.)

General formula (II) :

[0013]

[Formula 4]



[0014]

(S(OH) q-1 shows among a formula the sugar residue excluding one hydroxyl group from the sugar compound which consists of q hydroxyl groups combined with the sugar frame S and it, and m shows 2-10.)

A sugar content copolymer given in the term 1 whose mole fraction of term 2: (I) and (II) is 2:8-3:7.

[0015]

Term 3: A sugar content copolymer given in the term 1 or either of 2 whose weight average molecular weight is  $5 \times 10^6$  to  $2 \times 10^7$ .

[0016]

Term 4: A sugar content copolymer given in the term 1 thru/or either of 3 whose n in a general formula (I) is 3 and whose m in a general formula (II) is 4.

[0017]

Term 5: Support for gene delivery formed in a term 1 thru/or either of 4 from the sugar content copolymer of a publication.

[0018]

[Embodiment of the Invention]

Hereafter, this invention is explained concretely.

[0019]

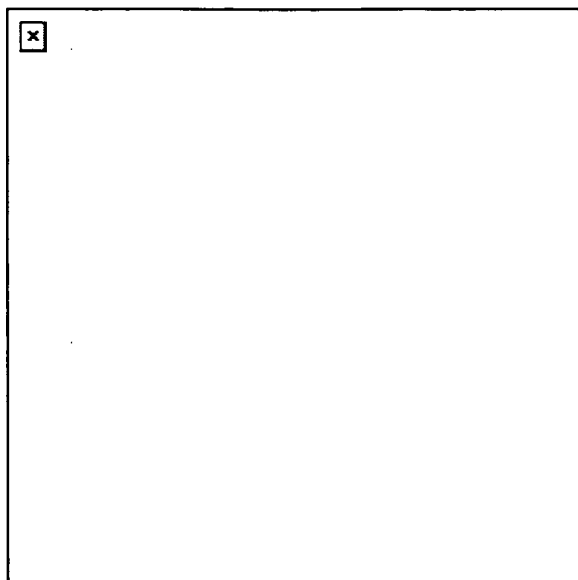
Sugar content copolymer

The sugar content copolymer of this invention has the repeat unit expressed with a general formula (I) and (II).

General formula (I) :

[0020]

[Formula 5]



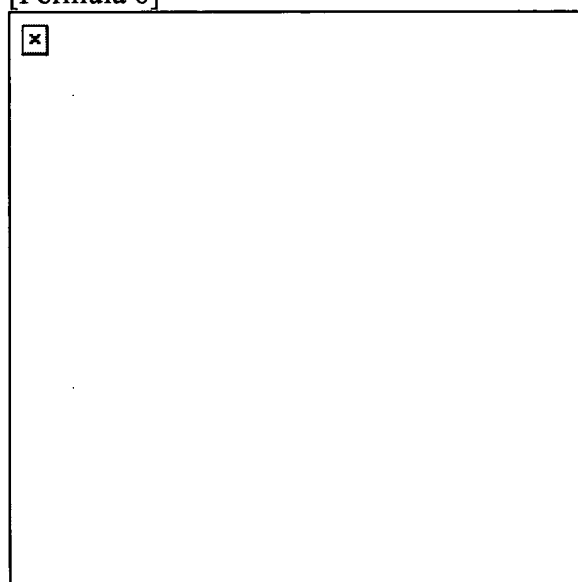
[0021]

(n shows 1-10 among a formula.)

General formula (II) :

[0022]

[Formula 6]



[0023]

(S(OH) q-1 shows among a formula the sugar residue excluding one hydroxyl group from the sugar compound which consists of q hydroxyl groups combined with the sugar frame S and it, and m shows 2-10.)

The general formula (I) and the mole fraction of (II) in a sugar content copolymer are 1:9 to about 9:1, and they are used according to the object, adjusting them suitably.



[0024]

Especially, that a general formula (I) and whose mole fraction of (II) are 2:8 to about 3:7 tends to form DNA and complex, and is desirable at the point that gene expression effectiveness is high.

[0025]

n in a general formula (I) can be suitably set up for the purpose of 1-10, and m in a general formula (II) obtaining the copolymer which shows 2-10 and has a desired property.

[0026]

The sugar content copolymer whose n especially in a general formula (I) is 3 and whose m in a general formula (II) is 4 is desirable in the point that the compatibility to the cell of sugar increases at the time of the incorporation by the ease of carrying out and cell of complex formation with a gene.

[0027]

The molecular weight of a sugar content copolymer is usually about  $1 \times 10^4$  to  $5 \times 10^8$  in weight average molecular weight. Especially, what is about  $5 \times 10^6$  to  $2 \times 10^7$  is desirable at the point that gene expression effectiveness is high.

[0028]

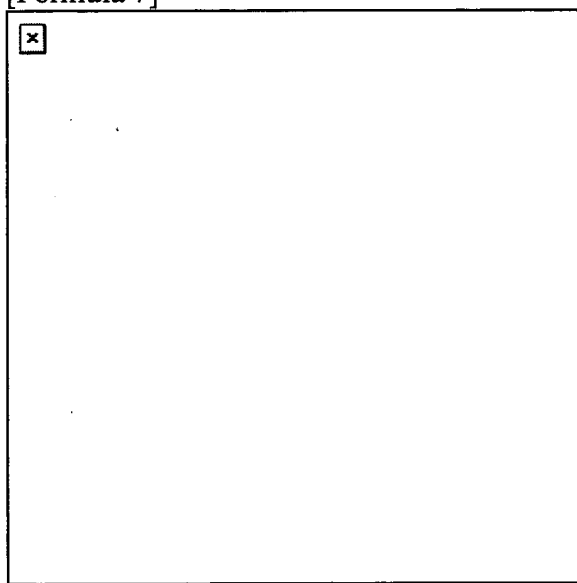
The manufacture approach of a sugar content copolymer

The sugar content copolymer of this invention can be obtained by carrying out the polymerization of the cationic monomer expressed with a general formula (III), and the sugar content monomer expressed with a general formula (IV).

General formula (III) :

[0029]

[Formula 7]



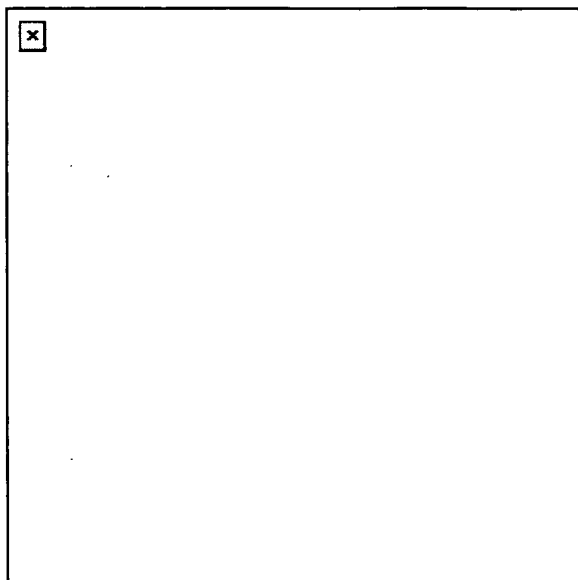
[0030]

(n shows 1-10 among a formula.)

General formula (IV) :

[0031]

[Formula 8]



[0032]

(S(OH) q-1 shows among a formula the sugar residue excluding one hydroxyl group from the sugar compound which consists of q hydroxyl groups combined with the sugar frame S and it, and m shows 2-10.)

Although the value of n in the cationic monomer expressed with a general formula (III) can be suitably set up according to the object, its dimethylaminopropyl acrylamide which is n= 3 is especially desirable from the point of the ease of manufacturing etc.

[0033]

Moreover, although the value of m in the sugar content monomer expressed with a general formula (IV) can also be suitably set up according to the object, the vinyl adipate which is especially m= 4 is suitable in terms of stability, the ease of compounding, etc.

[0034]

Moreover, as a sugar compound which has the sugar frame S in a general formula (IV), natural sugar, synthetic sugar, etc. of monosaccharides, such as a glucose, a fructose, a mannose, a galactose, a sucrose, a maltose, starch, and a cellulose, small sugar, a polysaccharide, and a polysaccharide, such as a hydrolysis product, are mentioned, for example. Among these, a glucose is desirable in respect of the ease of manufacturing etc.

[0035]

As an approach of carrying out the polymerization of the cationic monomer expressed with a general formula (III), and the sugar content monomer expressed with a general formula (IV), a radical polymerization etc. is mentioned, for example.

[0036]

Moreover, as a polymerization initiator, the usual radical polymerization initiator can be used, for example, azo system initiators, organic peroxide, etc., such as azo isobutyl nitril (azobisisobutyronitrile), can be used.

[0037]

Support for gene delivery

The sugar content copolymer of this invention can be suitably used as support for gene delivery.

[0038]

In gene delivery, according to an electrostatic operation, the sugar content copolymer used as support condenses a gene, and forms complex. This complex will be incorporated by endocytosis at a cell and a gene will be sent to intracellular.

[0039]

Since it contains the residue which has the repeat unit expressed with a general formula (I), and has positive charge by physiological pH within the limits, according to an electrostatic operation, the sugar content copolymer of this invention condenses molecules, such as DNA, is more efficient and can introduce a gene.

[0040]

Moreover, since the copolymer of this invention has the repeat unit expressed with a general formula (II) and contains the sugar frame and the non-charge hydrophilic group, water solubility and its biodegradability improve and in-the-living-body moving state control is easier for it.

[0041]

Higher gene expression effectiveness becomes possible by considering as the copolymer which has (I) and (II) by mole fraction 2:8-3:7 especially.

[0042]

Although it will not be restricted as a gene carried by support especially if it is DNA or RNA, as an example, a gene, an antisense DNA, etc. which carry out the code of the specific protein are mentioned.

[0043]

moreover, the ratio of the sugar content copolymer in complex, and a gene -- the mol of the cation radical of a sugar content copolymer -- the mol of DNA of a number (C), or the phosphoric-acid radical of RNA -- the ratio (this is hereafter called C/A ratio) to a number (A) -- expressing -- usually -- it is ten or more still more preferably five or more preferably 2.5 or more. Manifestation effectiveness becomes high, so that a C/A ratio becomes large.

[0044]

Especially the approach of forming the complex of a sugar content copolymer and a gene can be suitably adjusted by mixing the solution which is not limited, for example, contains a gene, and the solution containing a sugar content copolymer.

[0045]

[Example]

Hereafter, although this invention is explained still more concretely using an example and the example of a comparison, this invention is not limited to these.

[0046]

Examples 1-4: Creation of a sugar content copolymer

Dimethylaminopropyl acrylamide (DMPAA:Dimethylaminopropyl acrylamide) and 6-vinyl horse mackerel POIRU glucose (GVA : 6-vinyladipoyl glucose) were used by the preparation ratio shown in a table 1. Dimethyl sulfoxide (DMSO:Dimethyl sulfoxide) was used as a solvent, azobisisobutyronitril (azobisisobutyronitrile) was used as a polymerization initiator, and the polymerization was carried out with the reaction temperature of 60 degrees C for bottom 4 hours of a vacuum.

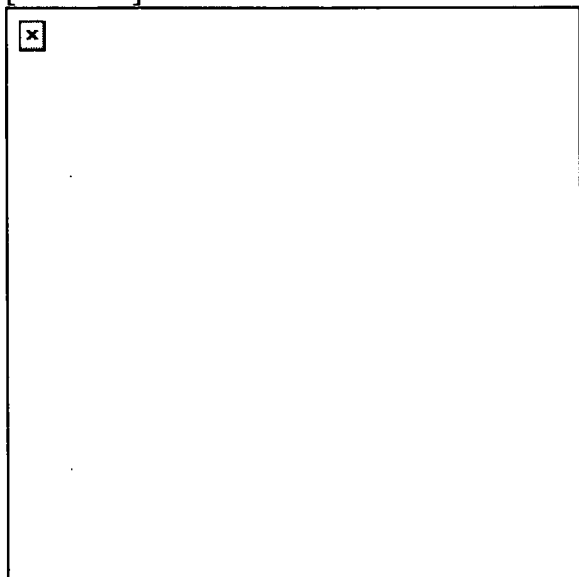
[0047]

The yield of the obtained sugar content copolymer, weight average molecular weight, and the copolymerization presentation ratio for which it asked by NMR measurement are shown in a table 1. In addition, GPC / RID detector (made in Shimadzu) was used as a detector, alpha-M (TOSOH) was used for it as a column, and the mean molecular weight computed it with pullulan

conversion molecular weight.

[0048]

[A table 1]



[0049]

Example 5: Preparation of sugar content copolymer-DNA complex

Plasmid pCMV-Luc was used as DNA. 2.4mg of sugar content copolymers created in the example 2 was dissolved in the D-MEM culture medium of 1000microl, and the stock solution was produced. mixing 5micro of this stock solution 1, and 45micro (pCMV-Luc being contained 100 ng) of pCMV-Luc solutions 1 -- a C/A ratio -- it was referred to as =50. Phase dilution of the stock solution was carried out, and the sample solution (C/A ratio = 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0) from which a C/A ratio differs was prepared by mixing with the pCMV-Luc solution of this concentration.

About the sample of a different C/A ratio, luciferase gene pCMV-Luc was mixed and electrophoresis was performed. A result is shown in drawing 1 .

[0050]

Consequently, the C/A ratio of a sugar content copolymer and DNA was larger than 3, the band became one, and it has checked that the complex of the sugar content copolymer of this invention and DNA was formed.

[0051]

Example 6: Assessment of transgenics

1x10<sup>4</sup> cells/well seeding of the COS-1 cell was carried out to each well of a 96 hole multi-plate, and phosphoric-acid buffer solution (PBS) removed supernatant liquid after washing 24 hours after. D-MEM 50microl of blood serum non-\*\* which adds independently 50micro [ of complex solutions ] l/well created in the above-mentioned example 5 to each well by various C/A ratios, and contains the chloroquine of 200microM in it further -- it added. After cultivating under 37-degree-C5%CO<sub>2</sub> conditions for 12 hours, it washed by PBS, and exchanged for the D-MEM culture medium (100microl / well) containing 10% of blood serum, and culture was continued for further 40 hours. The cell was processed for 30 minutes by Triton X-100 of 50microl after PBS washing, the cell was dissolved, the part (20microl) was sampled, and it mixed with the

luminescence substrate liquid of 100microl. Gene expression effectiveness was measured by carrying out the quantum of the luminescence reinforcement of each well with LUMI-COUNTER.

[0052]

A measurement result is shown in drawing 2 - drawing 3 .

[0053]

Drawing 2 shows the measurement result of gene expression effectiveness in luciferase activity. Moreover, drawing 3 shows the measurement result of gene expression effectiveness in the luciferase activity per protein.

[0054]

As shown in drawing 2 - drawing 3 , naturally activity was not seen only in DNA and a cell. Moreover, it had the amino group which carried out electrification to the end as an example of a comparison, and when the difference in manifestation effectiveness was investigated using the polymer (Superfect™, a C/A ratio = 5.0 and QIAGEN) which does not contain sugar, it was checked that the complex using the sugar content copolymer of this invention has higher gene expression effectiveness compared with Superfect™. Moreover, it was checked that manifestation effectiveness becomes high, so that the C/A ratio became large.

[0055]

[Effect of the Invention]

As shown in the result mentioned above, the support for gene delivery formed from the sugar content copolymer of this invention shows higher gene expression effectiveness compared with the conventional support for gene delivery. Moreover, biodegradability and water solubility of the copolymer of this invention are improving, and in-the-living-body moving state control is easy for it, and can use it more useful in the macromolecule field or the medicine field.

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing 1 is drawing showing the agarose gel (0.8%) electrophoresis of the complex of the sugar content copolymer which consists of various C/A ratios, and gene pCMV-Luc.

[Drawing 2] Drawing 2 is drawing which introduced the gene to COS-1 cell and measured gene expression effectiveness (when luciferase activity shows).

[Drawing 3] Drawing 3 is drawing which introduced the gene to COS-1 cell and measured gene expression effectiveness (when the luciferase activity per protein shows).

---

## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1]

The sugar content copolymer whose weight average molecular weight it has the repeat unit expressed with the following general formula (I) and (II), and the mole fraction of (I) and (II) is 1:9-9:1, and is  $1 \times 10^4$  to  $5 \times 10^8$ .

General formula (I) :

[Formula 1]

(n shows 1-10 among a formula.)

General formula (II) :

[Formula 2]

(S(OH) q-1 shows among a formula the sugar residue excluding one hydroxyl group from the sugar compound which consists of q hydroxyl groups combined with the sugar frame S and it, and m shows 2-10.)

[Claim 2]

The sugar content copolymer according to claim 1 whose mole fraction of (I) and (II) is 2:8-3:7.

[Claim 3]

A sugar content copolymer given in claim 1 or either of 2 whose weight average molecular weight is  $5 \times 10^6$  to  $2 \times 10^7$ .

[Claim 4]

The sugar content copolymer according to claim 1 to 3 whose n in a general formula (I) is 3 and whose m in a general formula (II) is 4.

[Claim 5]

Support for gene delivery formed from a sugar content copolymer according to claim 1 to 4.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**